新型重组毕赤酵母产人胰岛素前体的表达工艺研究*

彭强强，刘启，徐名强，张元兴，蔡孟浩**

（华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室，上海，200237）

摘要：以毕赤酵母为异源表达宿主合成人胰岛素前体，在实验室研究和工业生产中已有广泛应用。目前研究主要使用天然甲醇诱导型 *AOX1* 启动子，以甲醇为单一基础碳源进行胰岛素前体的诱导发酵生产。但在毕赤酵母高密度发酵生产过程中，甲醇代谢过程耗氧大、产热高，补料控制工艺复杂，限制了发酵生产的放大。本研究基于我们前期对启动子 *AOX1* 的转录调控设计研究，提出以人工设计的高效组成型转录调控器件 CSAD_5 驱动胰岛素前体基因表达，开发了葡萄糖为碳源的发酵生产工艺，以解决甲醇体系中的产热、耗氧以及工艺控制问题。在此基础上，通过增强筛选压力提高异源基因拷贝，获得了一株胰岛素前体高表达重组毕赤酵母，利用优化的培养工艺在 5 L 反应器水平发酵生产，胰岛素前体产量在 108 h 达到 1.85 g/L，为目前报道以葡萄糖为碳源，生产人胰岛素前体的最高水平。该研究为胰岛素前体的工业生产以及毕赤酵母的应用提供了新的思路和方法。

关键词：毕赤酵母；胰岛素前体；发酵工艺；高产菌株筛选

中图分类号：Q815

Heterologous expression of insulin precursor in a newly engineered *Pichia pastoris*

PENG Qiang-qiang, LIU Qi, XU Ming-qiang, ZHANG Yuan-xing, CAI Meng-hao **

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science & Technology, Shanghai, 200237, China)

Abstract: *Pichia pastoris* is one of the most widely used heterologous expression host in the synthesis of human insulin precursors both in laboratory research and industrial production. Currently, the induction fermentation production of insulin precursors is carried out mainly by using the naturally methanol-inducible *AOX1* promoter and utilizing methanol as the sole carbon source. High oxygen consumption, heat release and complicated feeding process control caused by methanol catabolism usually bring difficulties to industrial scale-up and limited application for protein expression by high cell densities fermentation in *Pichia pastoris*. A synthetic efficient constitutive transcriptional signal amplification device of CSAD_5 was constructed to drive insulin precursor gene expression based on the transcriptional regulation design of the *AOX1* promoter in our previous work. In order to reduce the oxygen consumption, heat generation and bioprocess regulation during fermentation process, a glucose supported fermentation process is established. Through increasing module-specific antibiotic stress to optimize the biosynthetic gene dosages, a recombinant *Pichia pastoris* strain producing 1.85 g/L insulin precursor was screened in 108 h in a 5-L bioreactor, which is the highest productivity to produce human insulin precursor by utilizing glucose as a carbon source according to reports. Our findings provide a new alternative choice to the high-yield production of insulin precursor in industrial application and reveal the potential of *Pichia pastoris* to produce a wide range of compounds.

Key words: *Pichia pastoris*; insulin precursor; fermentation process; high-producing strains

收稿日期：2018-11-30　修回日期：2019-01-26

* 国家自然科学基金面上项目(31870073)；上海科技创新行动计划基础研究领域项目（17JC1402400）；中央高校基本科研业务费(22221818014)

**通信作者，电子信箱：cmh022199@ecust.edu.cn

胰岛素是由胰岛β细胞分泌可调节血糖稳定的一种小分子蛋白激素[1]，是治疗胰岛素依赖型糖尿病的特效药[2]，具有巨大的市场需求。目前一般通过基因工程方法，利用大肠杆菌或酵母表达系统表达人胰岛素前体，然后加工成有活性的人胰岛素[3]。

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统是目前应用最为广泛的外源蛋白表达系统之一[4]。其基因操作简单、外源基因遗传稳定[5]；外源基因多拷贝整合筛选方法成熟[6,7]；相比原核表达系统，具有成熟的翻译后修饰[8]；高密度发酵的培养基成分简单[9]，利于产品分离纯化。2006 年，毕赤酵母被美国 FDA 认定为安全的微生物（Generally recognized as safe, GRAS）[10]。目前已有超过 5000 个外源蛋白在毕赤酵母中成功表达[5]。

应用毕赤酵母生产胰岛素前体已有多年研究[11,12]。目前研究主要以甲醇为唯一碳源和诱导剂，利用毕赤酵母高效的 *AOX1* 启动子（P_{AOX1}）来启动胰岛素前体基因的表达[13]。P_{AOX1} 严格依赖于甲醇诱导，调节模式单一，受多种常用碳源严格阻遏[14,15]，导致工业生产可用碳源受限。以甲醇为碳源进行大规模生产耗氧大，产热高，补料控制工艺复杂[8,16,17]，其代谢副产物 H_2O_2 会导致部分目标蛋白水解[18]。为解决高表达异源蛋白对甲醇的依赖，研究者们在毕赤酵母中鉴定了非甲醇依赖的启动子如 P_{GAP}、P_{ICL1} 和 P_{PHO89} 等，但是其表达能力均弱于 P_{AOX1}，难以维持高效表达[19,20]。已有文章报道，利用 P_{GAP} 可以在非甲醇条件下表达胰岛素前体，但是产量较低，30 L 反应器水平最高为 0.3 g/L，仅达到 P_{AOX1} 的 30%[21]。此外还有一些研究通过对 P_{AOX1} 进行改造，使其可以在常规碳源（如葡萄糖）条件下表达胰岛素前体，但是仍难以解决表达量低，工艺复杂的问题[22]。因此，如何在维持异源蛋白高效表达的同时，消除甲醇依赖，是解决这些问题的关键。

本实验室前期设计构建了在葡萄糖、甘油、甲醇等多种碳源条件下都可以高效启动目的基因表达的转录信号增益器件 CSAD。该设计调用了大肠杆菌乳糖操纵子中可互相结合的生物学元件，LacI / *lacO*，将 P_{AOX1} 转录激活因子 Mit1 激活域与 LacI 进行融合表达，用 *lacO* 序列替换原始 P_{AOX1} 上游调控序列[23]，最终构建获得生物器件 CSAD。以此为基础，本实验室进一步优化设计获得了增强型器件 CSAD_5。本研究利用 CSAD_5 器件驱动胰岛素前体表达，筛选获得了一株单拷贝表达菌株；针对胰岛素前体生产菌株进行反应器水平发酵，开发以葡萄糖为碳源、高效表达胰岛素前体的发酵生产工艺；基于此葡萄糖为碳源的发酵工艺，通过提高抗生素筛选高产菌株，进一步探索了毕赤酵母工业化生产胰岛素前体的潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

毕赤酵母 GS115 菌株购自 Invitrogen 公司，P_{AOX1} 驱动胰岛素前体表达的单拷贝菌株 WT-IP 和 CSAD_5 驱动胰岛素前体表达的单拷贝菌株 CSAD_5–IP，分别由实验室已有的 pPIC9K-IP 质粒及 pCSAD_5–IP 质粒经 Sal Ⅰ线性化处理，电转化到 GS115 感受态细胞中，筛选鉴定得到。CSAD_5-IP1 到 CSAD_5-IP10 系列菌株参照 1.2.4 所示方法筛选得到。

1.1.2 培养基

YPD、YND 、YNM 、MGY、BSM 基础培养基、PTM1 微量元素、 G418 抗生素以及生物素的组成与配制，参照 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册（www.thermofisher.com）。

1.1.3 主要仪器设备

实验所用 5 L 生物反应器，为上海国强生化工程装备有限公司 FGM-5L (III 型)生物反应器。高效液相色谱仪为 Agilent 1260，分析软件为 Agilent ChemStation。

1.2 方法

1.2.1 胰岛素前体 HPLC 检测

胰岛素前体采用高效液相色谱（HPLC）法检测[22]。色谱仪为 Agilent 1260；色谱柱为

C18 柱子（Kromasil^{TM}, Sweden, 250 mm×4.6 mm×5µm, 100 Å-spherical silica）；流动相 A 为 0.1% 三氟乙酸(TFA)，B 为 100% 乙腈；柱温 26°C，进样量 20 µl，流速 1 ml/min，紫外检测波长 280 nm；15%B 平衡，洗脱程序为：0~20 min，15%~60%B;20~25min，60%~100% B。

1.2.2 胰岛素前体菌株摇瓶发酵

相应菌株由甘油管接种至装有 YPD 培养基的血清瓶中培养至对数期，12000 *g* 离心 2 min 收集菌体，无菌水清洗两次后，以 OD_{600} =1 的终浓度接种至装有 50 ml YNM 或 YND 的 500 ml 挡板瓶中进行发酵。每隔 24 h 补加相应碳源至初始浓度，同时取样 1 ml，12000 *g* 离心 5 min，取上清检测胰岛素前体产量。文中涉及所有毕赤酵母菌株摇床培养条件均为 30℃、200 r/min。

1.2.3 胰岛素前体菌株 5 L 反应器发酵

种子培养：接种到发酵罐的种子分别在摇瓶中培养，进行甘油分批培养时种子培养基使用 MGY 培养基，进行葡萄糖分批培养及补料时种子培养基用 YND 培养基。培养时先由甘油管接种至装有 YPD 培养基的血清瓶中培养至对数期作为一级种子。将一级种子按照 1：40 比例再接到 300 ml MGY 培养基或者 YND 培养基中，培养至对数生长期作为二级种子。二级种子全部接入装有 3 L 基础盐培养基 BSM(按 4.5 mL/L 添加 PTM1)的 5 L 反应器中。

甲醇发酵工艺：起始发酵阶段向培养基中加入 40 g/L 甘油，待甘油耗尽，溶氧急剧上升，开始补加甘油至菌体湿重达到 250 g/L 左右，停止甘油补料。停止补料 0.5 h 后切换至甲醇补料。手动补加无水甲醇 4 mL 后停止，待溶氧下降又回升后等待 0.5 h，重复以上操作，切换至自动补加甲醇，梯度提高无水甲醇补加速率至所需。发酵过程溶氧控制在 30%~50%，可以通过在 200~1000 r/min 范围内控制转速及 2~6 L/min 调节通气量来调节溶氧，当转速和通气均达到最大值时可通入纯氧来满足要求。通过发酵罐联动的 pH 调节蠕动泵控制补入氨水的量来调控 pH，批培养阶段 pH 5.0，诱导阶段 pH 3.5。整个发酵过程温度均控制在 30℃。

葡萄糖发酵工艺：起始发酵阶段向培养基中加入 40 g/L 葡萄糖，待葡萄糖耗尽分批阶段结束后，即以相应的恒定速率限制性流加 50%(w/v)葡萄糖溶液，直至发酵结束。发酵过程溶氧、pH 与温度控制与甲醇发酵工艺相同。

1.2.4 高产菌株的筛选

参照 Multi-Copy Pichia Expression Kit（Invitrogen）所示方法，将 pCSAD_5–IP 质粒经 Sal Ⅰ线性化处理，电转化到 GS115 感受态细胞中，取 50、100、150、200、250 µl 复苏液分别涂布于 YPD 加 0.5、1、1.5、2、3 mg/ml G418 平板上于 30℃培养箱中培养。挑取转化子培养至对数期，稀释到 OD_{600} = 0.1 取 4 µl 在不同 G418 浓度的 YPD 平板上点板。在某一 G418 浓度下可以生长而更高浓度下不能生长的菌株，则该浓度即为其可耐受最大之浓度，得到一系列对 G418 耐受程度不同的菌株。

1.2.5 数据分析方法

文中所有柱状图使用 Graphpad prism 6.0(GraphPad Software)制作，所有折线图使用 Origin8.0(OriginLab)制作。文中所有菌体湿重及胰岛素前体产量结果均进行三次实验平行。采用 Student's *t*-test 进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 胰岛素前体单拷贝菌株在摇瓶中的发酵表达

为验证单拷贝菌株 CSAD_5–IP 表达胰岛素前体的能力，按照 1.2.2 所示方法，将其与 WT-IP 菌株分别进行摇瓶水平发酵。WT-IP 菌株在 0.5%(v/v)的甲醇条件下诱导发酵，CSAD_5-IP 菌株分别在 0.5%、1%(v/v)甲醇条件和 0.5%、1%、2%(w/v)葡萄糖条件下进行发酵。结果如图 1 所示，CSAD_5-IP 菌株在甲醇浓度为 0.5%(v/v)时产量高于 1%(v/v)甲醇条件，为 4.9 mg/L，与 WT-IP 菌株在甲醇条件下的产量相当；CSAD_5-IP 菌株在葡萄糖浓度为

1%(w/v) 时产量最高，为 6.2 mg/L，相比 WT-IP 菌株在甲醇条件下胰岛素前体产量提高约 30%。

以上结果表明，CSAD_5-IP 菌株在甲醇和葡萄糖为碳源条件下，均可以成功表达胰岛素前体，且在葡萄糖为碳源时菌株 CSAD_5-IP 的产量高于野生型菌株在甲醇条件下的产量。在 5 L 反应器水平分别探索甲醇及葡萄糖为碳源的发酵工艺，以进一步提升目标蛋白产量，测试工业应用潜力。

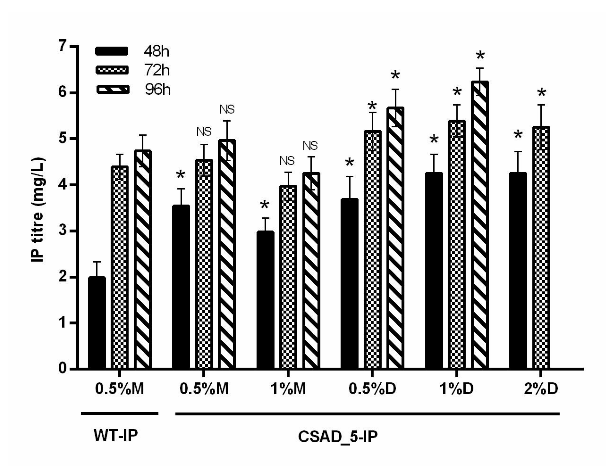


图 1　CSAD_5-IP 菌株在摇瓶中的胰岛素前体表达量

Fig.1 Production of insulin precursor of WT-IP and CSAD_5-IP in baffled flask culture.

Error bars are plotted from 3 individual replicates. The asterisk marks indicate the significance levels between WT-IP and CSAD_5-IP at the same time points (* $p<0.05$; NS, not significant).

2.2　胰岛素前体单拷贝菌株 5 L 反应器发酵工艺探索

2.2.1 胰岛素前体单拷贝菌株 5 L 反应器甲醇发酵工艺分析

使用低流速甲醇补料工艺时，发酵过程的耗氧及产热均有明显降低[24]，为探索较低的甲醇补料速率对 CSAD_5-IP 菌株生长及产物生成的影响，按照 1.2.3 所示发酵工艺，采用 3.33、6.67 及 12.0 ml/(h·L broth)三种不同甲醇补料速率探究 CSAD_5-IP 菌株生长及胰岛素前体表达，WT-IP 菌株甲醇补料速率为 12.0 ml/(h·L broth)。

如图 2 所示，随着甲醇补料速率提高，CSAD_5-IP 菌株湿重逐渐提高，同时胰岛素前体产量也相应上升。当补料速率为 12.0 ml/(h·L broth)时，CSAD_5-IP 菌株生长速率最快，生长状态与野生株相似，这一条件下胰岛素前体在发酵 100 h 产量达到最高为 0.32 g/L，仅达到 WT-IP 菌株最高产量 0.64 g/L 的 50%。以上结果表明，在 5 L 反应器水平甲醇工艺下，CSAD_5-IP 菌株产量相对较低，需要探索其它工艺。

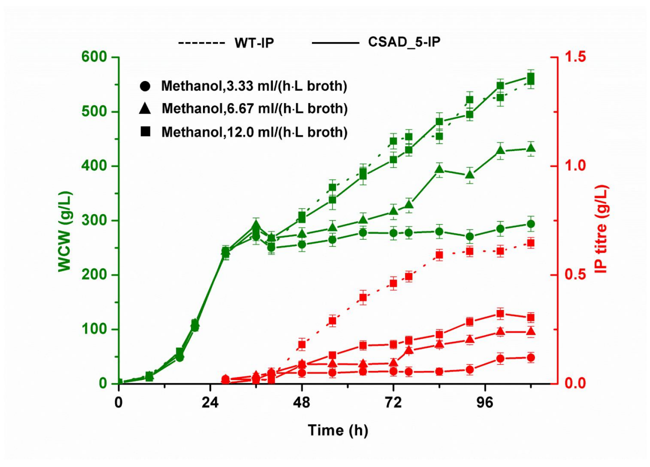


图 2　不同的甲醇补料速率对生长及产物生成的影响

Fig.2 Wet cell weight (WCW) and insulin precursor (IP) expression of CSAD_5-IP and WT-IP at different methanol feeding rates in a 5-L bioreactor fermentation.

Three different methanol feeding rates of 3.33, 6.67, and 12.0 mL/(h·L broth) were used for CSAD_5-IP and an optimal methanol feeding rate of 12.0 mL/(h·L broth) was used for WT-IP in induction phase. Error bars are plotted from 3 individual replicates.

2.2.2 胰岛素前体单拷贝菌株 5 L 反应器葡萄糖发酵工艺探索

为探究不同的葡萄糖补料速率对 CSAD_5-IP 菌株生长及产物生成的影响，按照 1.2.3 所示葡萄糖发酵工艺，在分批阶段结束后，分别以 11.5、15.5 及 21.5 ml/(h·L broth)的补料速率补加 50%(w/v)葡萄糖溶液。

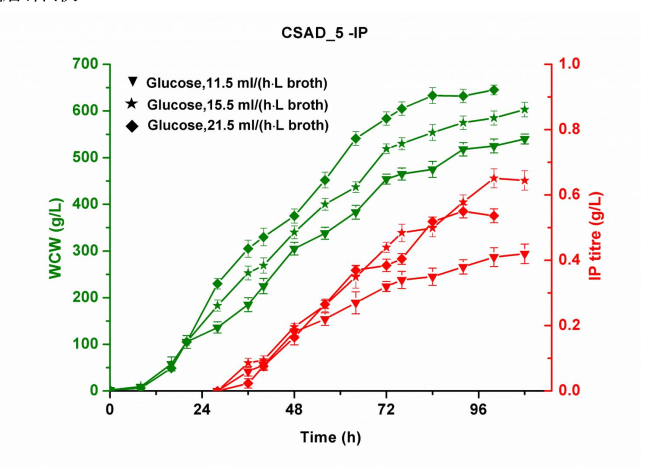


图 3 不同的葡萄糖补料速率对生长及产物生成的影响

Fig. 3 Wet cell weight (WCW) and insulin precursor (IP) expression of CSAD_5-IP at different glucose feeding rates in a 5-L bioreactor fermentation.

Three different glucose feeding rates is 11.5, 15.5, and 21.5 mL/(h·L broth), respectively. Error bars are plotted from 3 individual replicates.

如图 3 所示，当葡萄糖补料速率为 21.5 ml/(h·L broth)时，CSAD_5-IP 菌株在发酵 92 h 胰岛素前体产量达到最高为 0.55 g/L，随后其产量开始下降。这一速率下菌体生长明显加快，发酵 76 h 湿重就达到 600 g/L 以上，此后菌体生长缓慢，在发酵 100 h 时湿重达 645 g/L，此时发酵液粘度大幅增加，传质效率下降严重，溶氧无法控制在 30%以上，被迫停止发酵。说明较高葡萄糖补料速率不利于产物生产以及发酵过程控制。当葡萄糖补料速率为 11.5 ml/(h·L broth)时，菌体湿重及胰岛素前体产量均最低，这一速率下胰岛素前体在发酵 108 h 达到最高为 0.42g/L。当以 15.5 ml/(h·L broth)的补料速率补加葡萄糖时，胰岛素前体在发酵 100 h 时产量达到最高为 0.65 g/L，说明最佳的葡萄糖补料速率为 15.5 ml/(h·L broth)。

2.2.3 葡萄糖工艺与甲醇工艺发酵过程比较

如图 4 所示，5 L 反应器水平，CSAD_5-IP 菌株在 15.5 ml/(h·L broth)葡萄糖条件下的生长与 WT-IP 菌株在甲醇条件下的生长无明显差异；CSAD_5-IP 菌株在 100 h，合成胰岛素前体量最高为 0.65 g/L，与 WT-IP 菌株在甲醇条件下的最高产量相当。

在发酵控制方面，因甲醇对细胞存在毒害，为避免甲醇补料过量致使发酵失败， WT-IP 菌株在碳源切换（甘油至甲醇）时，需严格控制甲醇补料量，该碳源切换过程控制复杂、耗时长（约 8 h）需要丰富的经验。而 CSAD_5-IP 菌株发酵，无需切换碳源，从发酵开始至结束均使用葡萄糖为单一碳源，补料速率易于控制、操作工艺简单。在耗氧方面，如图 5 所示，WT-IP 菌株在发酵 44 h 时湿重达到 268 g/L，此时通气量、转速已达极限，在发酵 48 h 开始需通入高纯氧气（纯度 99.999%）来维持溶氧供给，随着发酵时间的进行，通入纯氧的量逐渐增加，最高达到总通气流量的 2/3；而 CSAD_5-IP 菌株整个发酵过程无需通入纯氧且通气

量也未达最高。而已有文献报道，毕赤酵母高密度发酵过程中，以葡萄糖为碳源时，其产热效率远低于甲醇为碳源（ΔH_S, methanol = -22.70 kJ g^{-1}; ΔH_S, glycerol = -17.98 kJ g^{-1} and ΔH_S, glucose = -15.58 kJ g^{-1}）[25,26] 。综上，菌株 CSAD_5-IP 基于葡萄糖体系的发酵，在胰岛素前体产量上与 WT-IP 甲醇发酵体系相当，但是在工艺控制、耗氧以及产热上均有明显优势。考虑到菌株 CSAD_5-IP 中的异源基因均为单拷贝，因此基于此葡萄糖发酵工艺，提升目的基因表达量，能够进一步提高胰岛素前体产量。

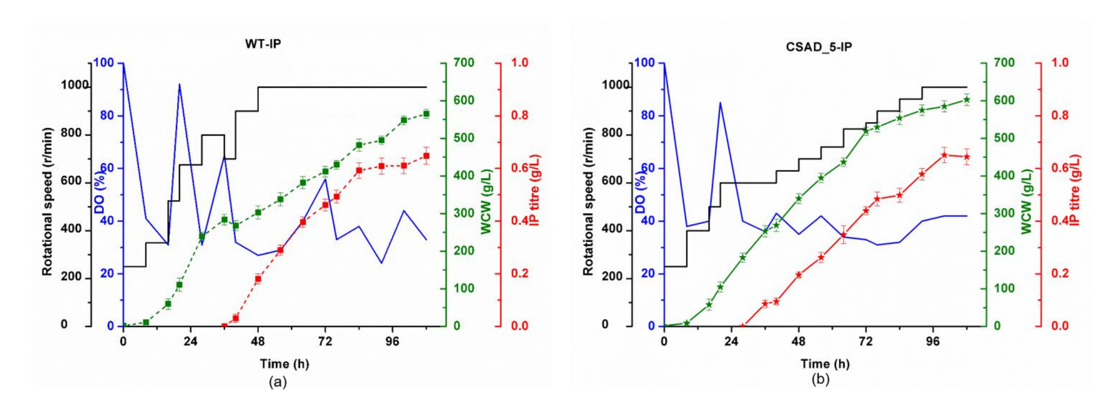


图 4 WT-IP 甲醇发酵工艺与 CSAD_5-IP 葡萄糖发酵工艺过程比较

Fig.4 Comparison of fermentation process for recombinant protein expression in the WT-IP and the CSAD_5-IP strains.

Time profiles of dissolved oxygen (DO), rotational speed, wet cell weight (WCW), insulin precursor (IP) in a 5-L bioreactor fermentation. (a):WT-IP; (b) :CSAD_5-IP.

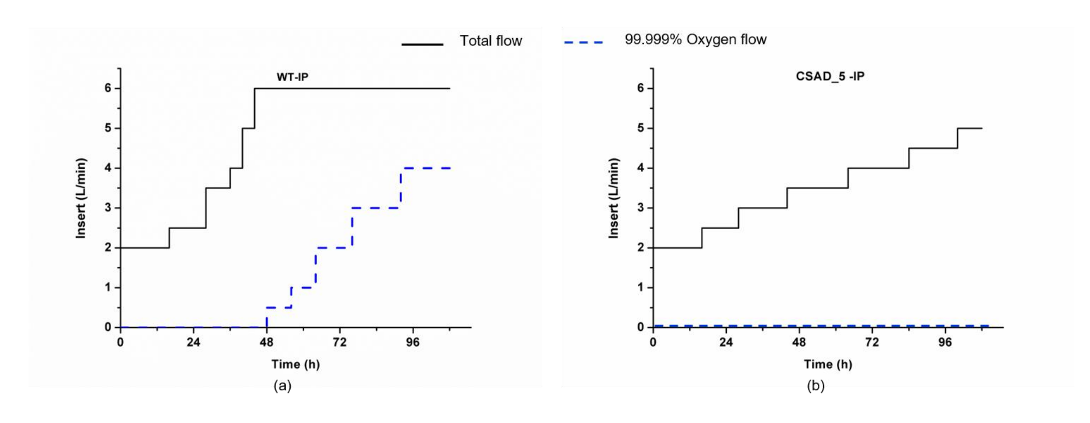


图 5 WT-IP 甲醇发酵工艺与 CSAD_5-IP 葡萄糖发酵工艺通气量比较

Fig.5 Comparison of insert air flow for recombinant protein expression in the WT-IP and the CSAD_5-IP strains.

Time profiles of total flow and 99.999%oxygen flow in a 5-L bioreactor fermentation. (a):WT-IP; (b) :CSAD_5-IP.

2.3 胰岛素前体高产菌株的筛选及验证

2.3.1 胰岛素前体高产菌株在摇瓶中的发酵表达

已有研究表明，提高抗生素筛选浓度是获得高拷贝基因表达转化子的常用方法[27]。因此，按照 1.2.4 Multi-Copy Pichia Expression Kit（Invitrogen）所示方法，筛选到 10 个毕赤酵母重组菌株，依次命名为 CSAD_5-IP1~CSAD_5-IP10。

将上述菌株在 1%(w/v)葡萄糖为碳源条件下进行摇瓶水平发酵，结果如图 6 所示，随抗生素筛选浓度提高，所得菌株胰岛素前体表达量逐步增加。耐受 3.0 mg/ml 浓度 G418 所得 CSAD_5-IP10 菌株，其胰岛素前体表达量最高为 15.6 mg/L，相比单拷贝菌株 CASD_5-IP，胰岛素前体表达量提高 1.5 倍。

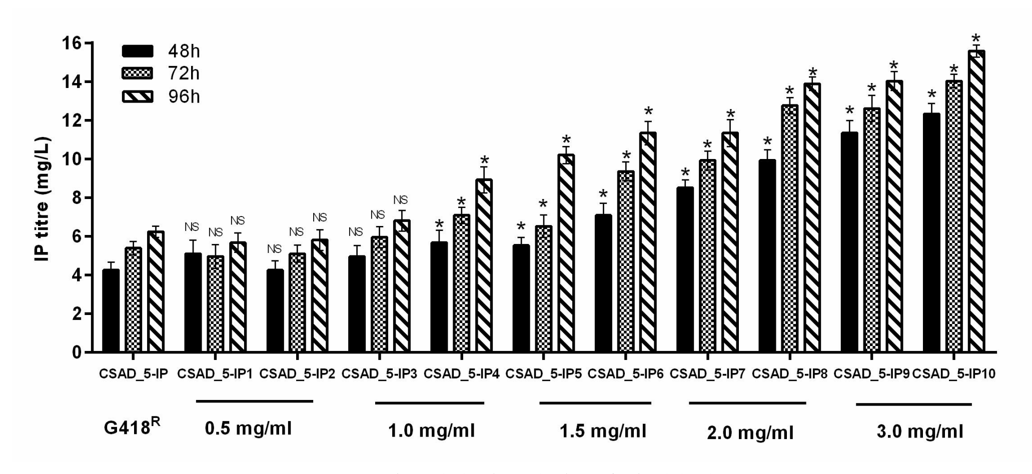


图 6 不同产量菌株在摇瓶中胰岛素前体表达量

Fig. 6 Production of insulin precursor of CSAD_5 –IP1~ CSAD_5-IP10 in baffled flask culture. Error bars are plotted from 3 individual replicates. The asterisk marks indicate the significance levels between CSAD_5-IP and high-producing strains in the same time (* p<0.05 NS, not significant).

2.3.2 胰岛素前体高产菌株在 5 L 反应器中的发酵表达

选取 CSAD_5-IP10 菌株采用优化的葡萄糖发酵工艺，在 5 L 反应器水平发酵表达胰岛素前体。如图 7 所示，CSAD_5-IP10 菌株在发酵 108 h 产量达到最高为 1.85 g/L。此前报道以葡萄糖为碳源，生产人胰岛素前体的最高水平为 1.28 g/L[20]。在生长方面，该菌株在发酵前 80 h 生长状况与野生型菌株无明显差异，从 80 h 到发酵结束湿重一直维持在 550 g/L 左右，但胰岛素前体产量仍在上升。CSAD_5-IP10 菌株整个发酵过程通气量、转速未达到最大，未有纯氧通入，说明该菌株不仅产量有明显提高，而且工艺控制更加简单，更适合工业应用。

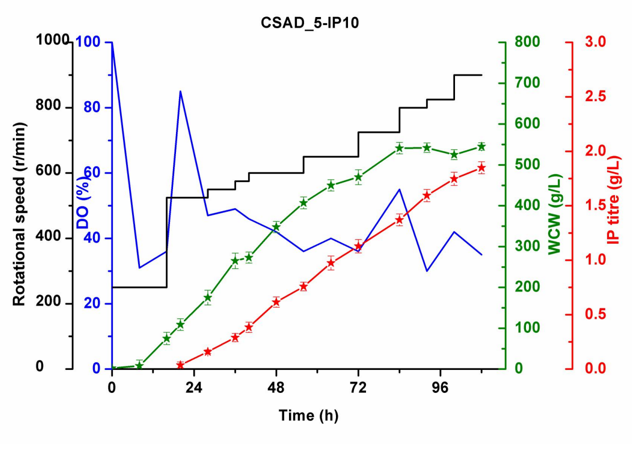


图 7　CSAD_5-IP10 葡萄糖发酵工艺发酵过程

Fig.7 The fermentation process of the CSAD_5-IP10 strains in recombinant protein expression in a 5 L bioreactor. Time profiles of dissolved oxygen (DO), rotational speed, wet cell weight (WCW), insulin precursor (IP). Error bars are plotted from 3 individual replicates.

3　讨论

我国是世界上糖尿病患者人数最多的国家，并呈现持续上涨的趋势[28]。胰岛素作为治疗胰岛素依赖型糖尿病的特效药，具有非常大的市场需求。因此提高胰岛素的产量，优化生产工艺，降低生产成本，具有明显的经济效益和科学研究价值。巴斯德毕赤酵母表达系统，作为主要的外源蛋白表达系统之一，由于其自身的优越性而被应用于人胰岛素前体的生产

[12]。此前研究主要集中于以甲醇诱导型启动子 P_{AOX1} 进行调控生产人胰岛素前体[13]。

在利用 P_{AOX1} 调控的发酵过程中，一般先以甘油作为碳源进行培养，来提高毕赤酵母的生物量，待甘油完全耗尽后，切换为甲醇以诱导蛋白表达[29]。由于甲醇对细胞的毒害，需严格控制其补料量，整个过程控制复杂、耗时长[8]；以甲醇为碳源发酵产热高、耗氧大[17]；甲醇作为易挥发的危险化学物质，在使用和储存过程中均存在潜在风险。这都为毕赤酵母的工业应用带来诸多限制。Celik 等[30]在毕赤酵母表达外源蛋白时，诱导阶段采用甲醇/山梨醇混合碳源补料，减少了甲醇的使用，但生产效果不如单一甲醇诱导。Wang 等[24]基于对 P_{AOX1} 转录因子的改造，开发了低流速甲醇补料工艺生产人胰岛素前体，在维持高效表达的同时，缓解了产热和耗氧的问题，但未改变甲醇发酵的工艺模式。Wang 等[31]还开发了葡萄糖/甘油交替补料工艺生产人胰岛素前体，避免了甲醇的使用，但无法实现葡萄糖作为单一碳源进行发酵。本研究利用高效组成型增益器件 CSAD_5 驱动胰岛素前体的表达，开发了以葡萄糖为碳源生产人胰岛素前体发酵工艺，整个发酵过程均使用葡萄糖为单一碳源，补料速率易于控制，操作工艺简单，氧耗低，产热少，具有工业应用优势。李等[21]利用天然组成型启动子 P_{GAP} 在非甲醇条件下表达人胰岛素前体，但是产量较低，30 L 反应器水平产量最高仅为 0.3 g/L。本研究中通过增强筛选压力获得的一株胰岛素前体高产菌株，利用开发的发酵工艺，在 5 L 生物反应器水平得到人胰岛素前体最高产量 1.85 g/L，为目前报道以葡萄糖为碳源生产人胰岛素前体的最高水平。总的来说，本研究在维持了人胰岛素前体高效表达的同时，消除了毕赤酵母对甲醇的依赖，为人胰岛素前体的工业生产及毕赤酵母的应用提供了新的思路和方法。

本研究通过提高筛选压力，筛选得到了一系列高产菌株，由图 6 所示人胰岛素前体的表达量随着菌株耐受抗生素浓度的增加而增加，后续可尝试进一步提高抗生素的浓度，筛选到产量更高的毕赤酵母菌株。Sawanan 等[32]研究表明，在毕赤酵母中分泌表达的胰岛素前体，其产量除了受转录水平的影响之外，和蛋白分泌效率也有很大的关系。梁等[33]在毕赤酵母中通过共表达促进高尔基体到细胞质膜的 SNAREs 组分，提高了毕赤酵母分泌异源蛋白的能力，进而提高了胰岛素前体的产量。除此之外，在异源蛋白表达过程中，蛋白折叠和降解也是影响其产量的重要因素。Gustavo 等[34]指出在毕赤酵母中内质网分子伴侣 Kar2/Bip 在异源蛋白正确折叠过程中起重要作用。Sreenivas 等[35]在毕赤酵母中敲除 *KEX1* 基因，有效减少了甘精胰岛素的降解。因此，后续可以在本研究的基础上，通过进一步筛选提高目的基因剂量，过表达 SNAREs 组分增加目的蛋白分泌效率，过表达 Kar2/Bip 降低目的蛋白的错误折叠率，敲除 *KEX1* 基因减少目的蛋白的降解等策略，进一步提高毕赤酵母生产人胰岛素前体的产量。

参考文献

[1] Tsukita S, Yamada T, Takahashi K, et al. MicroRNAs 106b and 222 improve hyperglycemia in a mouse model of insulin-deficient diabetes via pancreatic β-cell proliferation. EBioMedicine, 2017, 15(C): 163-172.

[2] Langley J, Adams G. Insulin-based regimens decrease mortality rates in critically ill patients: a systematic review. Diabetes/Metabolism Research and Reviews, 2010, 23(3): 184-192.

[3] Baeshen N A, Baeshen M N, Sheikh A, et al. Cell factories for insulin production. Microbial Cell Factories, 2014, 13(1): 141.

[4] Macauley-Patrick S, Fazenda M L, Mcneil B, et al. Heterologous protein production using the

Pichia pastoris expression system. Yeast, 2010, 22(4): 249-270.

[5] Schwarzhans J P, Luttermann T, Geier M, et al. Towards systems metabolic engineering in *Pichia pastoris*. Biotechnology Advances, 2017, 35(6): 681.

[6] Aw R, Polizzi K M. Liquid PTVA: a faster and cheaper alternative for generating multi-copy clones in *Pichia pastoris*. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 29.

[7] Nordén K, Agemark M, Danielson J Å, et al. Increasing gene dosage greatly enhances recombinant expression of aquaporins in *Pichia pastoris.* BMC Biotechnology, 2011, 11(1): 47.

[8] 黄鹏, 阎丽萍, 张宁, 等. 利用 *GAP* 启动子在毕赤酵母中组成型表达人鹅型溶菌酶 2. 中国生物工程杂志, 2018, 38(10): 55-63.

Huang P, Yan L P, Zhang N, et al. Constitutive expression of human goose-type lysozyme 2 in *Pichia pastoris* using the *GAP* promoter. China Biotechnology, 2018, 38(10): 55-63.

[9] Sreekrishna K, Brankamp R G, Kropp K E, et al. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Gene, 1997, 190(1): 55-62.

[10] Ciofalo V, Barton N, Kreps J, et al. Safety evaluation of a lipase enzyme preparation, expressed in *Pichia pastoris*, intended for use in the degumming of edible vegetable oil. Regulatory Toxicology & Pharmacology Rtp, 2006, 45(1): 1-8.

[11] Wang Y, Liang Z H, Zhang Y S, et al. Secretory expression of human insulin in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Acta Biochimica Et Biophysica Sinica, 1999, 31(5): 587-589.

[12] Kjeldsen T, Pettersson A F, Hach M. Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris*. Biotechnology & Applied Biochemistry, 2011, 29(1): 79-86.

[13] Ana L V, Nimtz M, Rinas U. Decrease of UPR- and ERAD-related proteins in *Pichia pastoris* during methanol-induced secretory insulin precursor production in controlled fed-batch cultures. Microbial Cell Factories, 2014, 13(1): 23.

[14] Wang X L, Wang Q, Wang J J, et al. Mit1 transcription factor mediates methanol signaling and regulates the alcohol oxidase 1 (*AOX1*) promoter in *Pichia pastoris*. Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(12): 6245-6261.

[15] Shen W, Xue Y, Liu Y Q, et al. A novel methanol-free *Pichia pastoris* system for recombinant protein expression. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 178.

[16] Mateles R I. Calculation of the oxygen required for cell production. Biotechnology & Bioengineering, 1971, 13(4): 581-582.

[17] 战春君, 李翔, 刘国强, 等. 巴斯德毕赤酵母甘油转运体的发现及功能研究. 中国生物工程杂志, 2017, 37(7): 48-55.

Zhan C J, Li X, Liu G Q, et al. Identification of glycerol transporter in *Pichia pastoris* and function research. China Biotechnology, 2017, 37(7): 48-55.

[18] Xiao A F, Zhou X S, Zhou L, et al. Improvement of cell viability and hirudin production by ascorbic acid in *Pichia pastoris* fermentation. Applied Microbiology & Biotechnology, 2006, 72(4): 837-844.

[19] Ahn J, Hong J, Park M, et al. Phosphate-responsive promoter of a *Pichia pastoris* sodium phosphate symporter. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(11): 3528-3534.

[20] Menendez J, Valdes I, Cabrera N. The *ICL1* gene of *Pichia pastoris*, transcriptional regulation and use of its promoter. Yeast, 2010, 20(13): 1097-1108.

[21] 李红亮, 陈勇, 陈海容, 等. 应用双启动子共表达体系提高人胰岛素原在毕赤酵母中的表达量. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(4): 422-425.

Li H L, Chen Y, Chen H R, et al. Increase of expression level of human proinsulin in *Pichia pastoris* by double promoter co-expression system. Chinese Journal of Biologicals, 2012, 25(4): 422-425.

[22] 王锦佳. 新型重组毕赤酵母中外源蛋白的诱导表达新工艺. 上海: 华东理工大学, 2017.

Wang J J. Novel strategies for induction expression of heterologous protein in a new type of recombinant *Pichia pastoris*. Shanghai: East China University of Science & Technology，2017.

[23] 刘一奇. 基于甲醇/乙醇底物的洛伐他汀及莫纳可林 J 异源生物合成. 上海: 华东理工大学, 2018.

Liu Y Q. Heterologous biosynthesis of lovastatin and monacolin J on methanol and ethanol by engineered *Pichia pastoris*. Shanghai: East China University of Science & Technology，2018.

[24] Wang J J, Wang X L, Shi L, et al. Reduced methanol input induces increased protein output by *AOX1* promoter in a trans-acting elements engineered *Pichia pastoris*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2018, 45(1): 25-30.

[25] Garcia-Ortega X, Ferrer P, Montesinos J L, et al. Fed-batch operational strategies for recombinant Fab production with *Pichia pastoris*, using the constitutive *GAP* promoter. Biochemical Engineering Journal, 2013, 79(41): 172-181.

[26] Jungo C, Marison I, Stockar U V. Mixed feeds of glycerol and methanol can improve the performance of *Pichia pastoris* cultures: A quantitative study based on concentration gradients in transient continuous cultures. Journal of Biotechnology, 2007, 128(4): 824-837.

[27] Scorer C A, Clare J J, Mccombie W R, et al. Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. Nature Biotechnology, 1994, 12(2): 181-184.

[28] 宁光. 中国糖尿病防治的现状及展望. 中国科学: 生命科学, 2018, 48(8): 810-811.

Ning G. Status quo and prospect of prevention and control of diabetes in China. Scientia Sinica Vitae, 2018, 48(8): 810-811.

[29] 钱凯, 张晶晶, 吴素平, 等. 利用 *GAP* 启动子在毕赤酵母中表达与纯化 GLP-1 类似物. 中国生物工程杂志, 2015, 35(5): 66-73.

Qian K, Zhang J J, Wu S P, et al. Constituted expression and purification of glucagon-like peptide-1 analogue in *Pichia pastoris* using *GAP* promoter. China Biotechnology, 2015, 35(5): 66-73.

[30] Celik E, Calik P, Oliver S G. Fed-batch methanol feeding strategy for recombinant protein production by *Pichia pastoris* in the presence of co-substrate sorbitol. Yeast, 2009, 26(9): 473-484.

[31] Wang J J, Wang X L, Shi L, et al. Methanol-independent protein expression by *AOX1* promoter with trans-acting elements engineering and glucose-glycerol-shift induction in *Pichia pastoris*. Scientific Reports, 2017, 7: 41850.

[32] Sawanan T, Tanapati P, Nanthika K, et al. Expression purification and biological activity of monomeric insulin precursors from methylotrophic yeasts. Protein Expression and Purification, 2019, 153(1): 35-43.

[33] 梁晨晨, 王立, 罗秋玲, 等. 一种增加毕赤酵母生产胰岛素前体的方法. 生物工程学报, 2017, 33(7): 1178-1189.

Liang C C, Wang L, Luo Q L, et al. A method to increase the production of insulin precursor in *Pichia pastoris*. Chinese Journal of Biotechnology, 2017, 33(7): 1178-1189.

[34] Gustavo R, Vanz A L, Lünsdorf H, et al. Fate of the UPR marker protein Kar2/Bip and autophagic processes in fed-batch cultures of secretory insulin precursor producing *Pichia pastoris*. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 123.

[35] Sreenivas S, Krishnaiah S M, Shyam Mohan A H, et al. Disruption of *KEX1* gene reduces the proteolytic degradation of secreted two-chain insulin glargine in *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification, 2016, 118: 1-9.